

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-149645

(43)Date of publication of application : 06.09.1983

(51)Int.Cl.

A23J 3/00

(21)Application number : 57-031978

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 01.03.1982

(72)Inventor : MOTOKI MASAO
NIO NORIKI
TAKINAMI KOICHI

(54) PREPARATION OF GELATINIZED MATERIAL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a gelatinized material, by adding transglutaminase to a protein-containing solution.

CONSTITUTION: Both vegetable protein such as defatted soybean, etc. and animal protein such as milk protein, gelatin, collagen etc. can be used. When 1 unit transglutaminase based on 1g protein is added to a solution containing 2W15wt% protein, and, if necessary, a polysaccharide, seasoning, coloring matter, etc., the solution is gelatinized in a short time, to give a gelatinized material stable to heat. Transglutaminase forming crosslinking by covalent bonds between the residues of glutamin and lysine, extracted from the liver of a guinea pig is used as the transglutaminase.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—149645

⑤ Int. Cl.³
A 23 J 3/00

識別記号

庁内整理番号
7915—4B

④ 公開 昭和58年(1983)9月6日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ ゲル化物の製造法

① 特 願 昭57—31978
 ② 出 願 昭57(1982)3月1日
 ③ 発 明 者 本木正雄
 横浜市金沢区釜利谷町1915—59
 ④ 発 明 者 丹尾式希

川崎市川崎区観音2—20—8
 ⑤ 発 明 者 滝波弘一
 横浜市港北区篠原台町3—16—310
 ⑥ 出 願 人 味の素株式会社
 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1 発明の名称 ゲル化物の製造法

2 特許請求の範囲

蛋白質濃度2重量%以上の蛋白含有溶液に、
 トランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1
 ユニット以上、添加してゲル化させることを特
 徴とするゲル化物の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は新規なゲル化物の製造法に関する。
 既存蛋白資源の中には、生物価が低い、機能
 特性が乏しい等の理由から利用が制限されてい
 るものが多い。これらの蛋白資源を意図的に組
 織化食品に適するような機能性、栄養性を有す
 る蛋白素材に改質する技術が確立されるなら、
 その利用度が増加するだけでなく、高品質の蛋
 白食品を作りうる。改質技術の一つとして酵素
 修飾による改質があるが、現状では加水分解酵
 素による改質が主なものであり、他の酵素の利
 用例は少ない。

本発明者らはアシル転移酵素の一つであるトラ
 ンスグルタミナーゼに着目し、食品蛋白中に含量
 の多いグルタミン (Gln と略す) 残基とリジン
 (Lys と略す) 残基間に架橋を形成させ、ゲル状
 物質を製造できることを発見し、本発明を完成し
 た。

即ち、本発明は蛋白質濃度2重量%以上の蛋白
 含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白1g
 に対して1ユニット以上、添加してゲル化させる
 ことを特徴とするゲル化物の製造法である。

本発明に用いられる蛋白質は、その起源に制約
 されるものではなく植物性蛋白質、動物性蛋白質
 などいかなるものでも使用できる。植物性蛋白質
 としては油糧種子の脱脂物 (脱脂大豆) 及びそれ
 らより分離した蛋白質を挙げることができる。ま
 た、動物性蛋白質としては乳蛋白質、ゼラチン、
 コラーゲン等を例示することができる。

これらの蛋白質の2重量%以上の蛋白含有溶液
 を調製する。蛋白含有溶液の濃度は比較的高いこ
 とが望ましく通常2重量%以上、好ましくは5重

量が多いし15重量多であればよい。この場合、澱粉、多糖類、調味料、着色料、香辛料などの食品添加物を配合することができる。これらの使用量は、後のトランスグルタミナーゼによるゲル化を阻害しない範囲で適宜選択して添加すればよい。蛋白溶液の濃度が2重量多より少ない場合には、溶液状態のまま、もしくは沈澱を生じゲル化しない。また、蛋白含有溶液のpHは6ないし9であれば好ましい。

この蛋白含有溶液にトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上添加してゲル化させる。このトランスグルタミナーゼはConnellanらの方法〔*Journal of Biological Chemistry*, 246(4), 1093(1971)〕に従って、モルモットの肝臓より調製される。即ち、モルモットの肝臓をシヨ糖溶液に分散させたものを遠心分離し、上清液を回収し、これにジエチルアミノエチルセルロースカラムにて分画することによつて、粗製トランスグルコシダーゼを得る。これを1%硫酸プロタミンで沈澱させ、沈澱物を

0.01Mとなるよう[] 酢酸ナトリウムを加え、酢酸にてpH 5.0に調整し、遠心分離する。得られた沈澱に0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.5)30ml添加しホモゲナイズする。この懸濁液を遠心分離し、その上清を0.001Mリン酸緩衝液(pH 7.5)に対して透析し、これを粗トランスグルタミナーゼ溶液として用いる方法である。

これらの方法は、操作順序を変化させたり、添加量、濃度、pH値分離装置などを若干変えても差しつかえない。このようにして得たトランスグルタミナーゼの蛋白濃度をロウリー法〔*Journal of Biological Chemistry*, 193, 265(1951)〕で、酵素活性をN-カルボベンゾキシー-L-グルタミニルグリニンとヒドロキシアミンを用いたヒドロキサム酸法〔*Journal of Biological Chemistry*, 241(23), 5518(1966)〕で測定すれば、調製した酵素溶液の比活性は6.0ないし13.0の範囲の値を示す。また、電気泳動によつて分子量を測定すると8.0万

回収する。さらにこの沈澱物を0.2M Tris-酢酸緩衝液で洗浄後、0.05M硫酸-5mM Tris-HCl緩衝液(2mM エチレンジアミン4酢酸(以下EDTAと略す)を含む)を用いて抽出し、得られた抽出液をカルボキシメチルセルロースカラムでプロタミンを除去し、口液に硫酸アンモニウム溶液(1M EDTAを含む)を添加し遠心分離を行ない、沈澱物を回収する。沈澱物を10mM Tris-酢酸緩衝液(1mM EDTA、0.16M KClを含む)で溶解し、遠心分離した上清液を10%アガロース(Bio Gel A-0.5M)でゲル濾過し、得られた高活性画分を限外濾過で濃縮し、精製されたトランスグルタミナーゼを得る。

他のトランスグルタミナーゼの調製法としては、Clarkeらの方法〔*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79, 338(1959)〕がある。即ち、モルモット肝300gに、0.25M シヨ糖溶液600mlを加え、ホモゲナイズする。これを遠心分離し、上清を得る。

ないし9.0万の範囲の値である。このトランスグルタミナーゼ溶液は-30℃程度の低温にて保存し、適時解凍して使用することができる。

このようにして得られるトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して1ユニット以上、添加してゲル化させる。添加量が1ユニットより少ない場合には、高粘性の溶液となる。また、2000ユニットより多く添加しても効果はそれほど変わらない。

トランスグルタミナーゼで蛋白分子にGlu-Lys架橋が生じることは知られている(J. E. Folk and J. S. Finlayson "Advances in Protein Chemistry," Vol. 31 ed. by C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, Academic Press, Inc., New York, N. Y., 1977, p. 1.)が、高い蛋白溶液にトランスグルタミナーゼを作用させた時に生成されるゲルがGlu-Lys架橋によるものである事は、以下の実験データから推察された。

① トランスグルタミナーゼの反応部位となる

Lys 残基をアセチル化及びサクシニル化した α sl カゼインにトランスグルタミナーゼを作
用させてもゲル化しなかつた。

- ② 反応溶液中に、S-S 還元剤であるジチオス
レイトールを共存させて反応を行なわせてい
るので、S-S 結合を主体とするゲルではな
い。
- ③ 加熱・冷却して得られる通常のゼラチンゲル
とトランスグルタミナーゼでゲル化させたゼ
ラチンゲルの各々の弾性率を測定したところ、
通常のゼラチンゲルは温度が高くなるにつれ、
著しく弾性率が低下した。これはゲルの網目
構造をつくる架橋が共有結合などのような強
い結合でなく、二次的結合であるため、温度
上昇とともにこの弱い結合が切れるためであ
ると考えられる。これに比してトランスグル
タミナーゼによるゲルは温度が変化しても、
その変化量は少なく、共有結合性の強いゲル
である事が示唆された。事実両方のゲルを
40°C以上さらすとトランスグルタミナーゼ

によるゲルは、そのままであるが通常のゼラ
チンゲルは溶融した。

以上より、Glu-Lys 架橋によつてゲルが生成
されており、S-S の架橋によるゲルではないと
考えられる。

このようにして得られたゲル化物は、比較的短
時間、即ち、1分以内、長くとも30分以内に
ゲル化し、しかも一般のゲル化物と同等のゲル物
性を備えたものである。

また、本発明で用いる蛋白含有溶液は単に蛋白
質と水との混合物に限らず、蛋白質、水及び油脂
を混合したエマルジョンであつてもよい。

更にこのゲル化物は加熱することにより、強度
のより強いゲルを作ることができる。

本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品と同様
にヨーグルト、ゼリーなどとして用いることはも
ちろん、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであ
るため、マイクロカプセルの素材、固定化酵素の
素材などとしても用いることができるものである。

実施例 1

以下の方法によりトランスグルタミナーゼを調
製した。モルモット肝800gに冷0.25Mシロ
糖溶液約2Lを加え、20000rpm、2分でホモ
ゲイズし、遠心分離(105,000×g、5℃、1
時間)を行ない上清を得た。

これを5mM・トリス・塩酸緩衝液(2mM
EDTA含有、pH7.5)で平衡化してある
DEAEセルロースカラムに添加・吸着させた後、
上記緩衝液の食塩濃度を0Mから1.0Mまで変化
させる勾配溶離法で分離し、酵素活性の高い画分
を得た。

これをゆつくりと攪拌しながら1%硫酸プロタ
ミン40mlを添加し、遠心分離(14,600×g、
15分、5℃)で沈殿を集め、これを0.2Mトリ
ス・酢酸緩衝液(pH6.0)に懸濁、ホモゲイズ
して洗い、遠心分離(2,500×g、1分、5℃)
で、沈殿を集めた。

この沈殿より、0.05M硫酸を含む5mMトリ
ス塩酸緩衝液(2mMEDTA含有、pH7.5)

を添加し、ホモゲイズすることによつて、ラン
スグルタミナーゼを抽出した。これを3度繰り返
し、集めた抽出液を5mMトリス・コハク酸緩衝
液(2mMEDTA含有、pH6.0)で平衡化し
たカルボキシメチル・セルロースカラムに添加し、
プロタミンを除去し、濾液に1MEDTA(pH
8.0)2.4mlと硫酸47.4gを加え、よく攪拌し
た後に、遠心分離(15,000×g、10分、5
℃)で沈殿を集めた。

これを10mMトリス・酢酸緩衝液(1mM
EDTA0.16MKCl含有、pH6.0)に溶解
し、遠心分離(27,000×g、30分、5℃)
で懸濁物を除いた後、上清を同じ緩衝液で平衡化
している10%アガロース(BioGela-0.5M)
でゲル濾過を行ない、活性の高い画分を集め、こ
れを10~20mg/mlの濃度となるよう限外濾過
(UM-10、フミコン社製)で濃縮し、トラン
スグルタミナーゼ溶液とした。この溶液を-30
℃以下で凍結保存し、適時溶解し使用した(尚、
これは常時5℃で操作し調製した。)

表1に示した基質蛋白にトランスグルタミナーゼを作用させ、ゲル化物を得た。

表 1

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
牛乳蛋白 ① α sl-カゼイン	生乳を遠心分離によつて脱脂しpH 4.5~4.8に調整し、酸沈カゼインを得る。これよりZittle ^{※1} の方法に従つて6.6 M尿素溶液に溶解し、水を加えて4.6 M尿素溶液とする。生じる沈殿を遠心分離で集め、希NaOH溶液にとかし、pH 7.2とする。これに酢酸アンモニウム-エタノールH ₂ Oを添加し、沈殿を除いて得られる上清をpH 5.0に調整し、生成する沈殿を希NaOHにとかし、pH 7.5とし、水に対して透析後、凍結乾燥し、 α sl-カゼインを得た。	5重量%溶液を0.1 M トリス-塩酸緩衝液(5 mM CaCl ₂ 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)を用い、1 mMに調整し、これに37℃でトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.1ユニット加えると、即座にゲル化した。
牛乳蛋白 ②Na-カゼイネート	サクラメントS(太陽化学株式会社)及びSolac(New Zealand Dacry Board 輸入元・日成共器株式会社)	①と同様にしてゲルを得た。但し、10重量%の濃度でトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.09ユニットを要した。

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
③大豆蛋白 11Sグロブリン	Thanh ^{※2} らの方法に従つて低温抽出脱脂大豆フレック(味の素 [®] 製)より、0.03 M トリス-塩酸緩衝液(10 mM-メルカプトエタノール含有、pH 8.0)で抽出し、抽出液をpH 6.4に調整、遠心分離によつて沈殿を集め、標準緩衝液にとかし、pH 7.6とし、遠心分離した上澄を透析後、凍結乾燥して11Sグロブリンとした。	②に同じ
④大豆蛋白 7Sグロブリン	Thanh ^{※2} らの方法に従つて、低温抽出脱脂大豆フレック(味の素 [®] 製)より、0.03 M トリス-塩酸緩衝液(10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0)で抽出し抽出液をpH 6.4に調整、遠心分離によつて沈殿を除き、得られる上澄をpH 4.8とし、生成する沈殿を集め、H ₂ Oに分散してpH 7.0とし、透析後、凍結乾燥して7Sグロブリンとした。	②に同じ
⑤分離状大豆蛋白	「アジプロンS-2」(味の素 [®] 製)	②に同じ

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
⑥水抽出大豆蛋白	低温抽出脱脂大豆フレック(味の素 [®] 製)を水に懸濁攪拌し、遠心分離後、上清を透析、凍結乾燥し、水抽出蛋白とした。	②に同じ
⑦酸沈澱蛋白(大豆)	低温抽出脱脂大豆フレック(味の素 [®] 製)を0.03 M トリス-塩酸緩衝液(10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0)に懸濁、攪拌し、遠心分離によつて上澄を得る。これをpH 4.8に調整し、生じた沈殿を集め、上記緩衝液に溶解し、透析後、凍結乾燥して、酸沈澱蛋白とした。	②に同じ
⑧大豆蛋白粒子	丸大豆を水に浸漬し3分間煮沸後、ホモゲナイザーで粉碎し、濾過(200 mesh)し遠心分離して蛋白粒子とした(特開昭56-68356号の方法)	②に同じ
⑨大豆蛋白ミセル	(特公昭56-31095号の方法)	②に同じ

基質蛋白	調 整 法	ゲ ル 化
⑩ゼラチン	メルク社製	10重量%溶液となるように0.1 M トリス-塩酸緩衝液(5 mM CaCl ₂ 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)を加え、これを60℃に加温しゼラチンを溶かす。すばやくトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.09ユニットを加え、よく攪拌後、37℃に保つと、即座にゲル化した。

※1 C. A. Zittle et al. J. Dairy Sci., 46, 1183 (1963)

※2 V. H. Thanh et al. J. Agric. Food Chem., 24(6), 1117 (1976)

実施例2

α slカゼイン、Na-カゼイネート、大豆蛋白11Sグロブリン、水抽出大豆蛋白、各々500 mgを0.1 M トリス塩酸緩衝液(5 mM CaCl₂、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)

表 2

蛋白質	基質濃度	2.0%	5.0%	10.0%
α_{s1} カゼイン		△	○	○
大豆蛋白11Sグロブリン		×	△	○
大豆蛋白7Sグロブリン		×	×	○

○：ゲル化

△：弱いゲル

×：溶液のまま

3.5 mlに溶解し、これに大豆油1.5 mlを加えて20000 rpmで3分間ホモゲナイズして乳化物を得た。これにトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.09ユニット加えると即座にゲル化物を得た。

実施例3

α_{s1} -カゼイン、大豆蛋白11Sグロブリン及び大豆蛋白7Sグロブリンの2, 5, 10重量%溶液を0.1 M トリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl_2 , 20 mM ジチオスレイトール含有 pH 7.6)で0.5 ml作成し、37℃で各々にトランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.1ユニットの割合で加えて、ゲル化するか否を判定し、表2の結果を得た。

実施例4

α_{s1} カゼインの5重量%溶液と大豆蛋白11Sグロブリンの10重量%溶液を0.1 M トリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl_2 , 20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)で調整し、これら溶液0.8 mlに対して、トランスグルタミナーゼを蛋白1 mgあたり $5 \times 10^{-4} \sim 2.0$ ユニット添加してゲル化するか否かを観察したところ、表3に示すような結果を得た。

表 3

蛋白質	酵素量(ユニット)	5×10^{-4}	1×10^{-3}	0.01	0.05	1.0	2.0
5重量% α_{s1} カゼイン		△	○	◎	◎	◎	◎
10重量% 11Sグロブリン		×	×	○	○	○	◎

◎：即座にゲル化した

○：1時間以上にゲル化

△：ゲルするが弱いゲル

×：溶液のまま

実施例5

5 mM CaCl_2 と20 mM ジチオスレイトールを含んだpH 7.0～pH 9.0のトリス・塩酸緩衝液を調整し、それを用いて、5重量% α_{s1} カゼイン溶液と10重量%大豆蛋白11Sグロブリン溶液を各0.8 mlずつ作成し、トランスグルタミナーゼを蛋白1 mgに対して0.1ユニット添加してゲル化するか否かを観察した。結果を表4に示す。

表 4

蛋白質	pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5重量% α_{s1} カゼイン		○	○	○	◎	◎
10重量% 11Sグロブリン		◎	◎	○	×	×

◎：即座にゲル化

○：ややゲル化に時間を要した

×：溶液のまま

実施例6

直径9.3 mm、高さ1.5 mmのテストピース作成容器に試料溶液1 mlを流し込み、下記に示す様にゲル化させて円筒ゲルを作成し、これをレオグラフム(東洋精機製作所製、CV-100)にて、18から25℃まで昇温させ、各温度の貯蔵弾性率を測定した。

① セラチン冷却ゲル

10重量%溶液となるように、セラチンに水を加え、60℃、3分で完全にセラチンを溶解

後、1 ml をテストピース作成容器に流し込み、3℃にて20分放置し、ゲル化させ室温に戻して測定した。

② セラチンTGaseゲル

セラチンに10重量%溶液となるように0.1 M トリス塩酸溶液 (5 mM CaCl_2 、2.0 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) を加え、60℃、3分で完全にセラチンを溶解し、テストピース作成容器に流し込み、すばやくトランスグルタミナーゼをセラチン1gに対して0.1ユニットの割合で加え、室温に1時間放置しゲル化させ、測定した。

結果を図1に示す。セラチン冷却ゲルは温度が増加するとともに貯蔵弾性率が著しく低下するが、それに比してセラチンTGaseゲルは温度変化の影響が少なかった。

実施例7

α_{s1} カゼインについては5重量%、大豆11Sグロブリンについては10重量%となるように

0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (5 mM CaCl_2 、2.0 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) で1 ml を調製し、これにトランスグルタミナーゼを蛋白1gに対して0.1ユニットを加えゲルを得た。このゲルを、さらに100℃に20分間保つた後、室温まで冷却した。

ゲル化させた直後のゲルと、加熱処理したゲルについてレオメーター (不動工業㈱、NRM-2002J) で、プランジャー (5φ、ボール型) を侵入させた時の最高荷重を測定し、ゲル強度とした。結果を表5に示す。

表 5

蛋白	未 加 熱	加熱処理後
5重量% α_{s1} ゲル	12.0 g	25.6 g
10重量% 11Sゲル	2.8 g	37.0 g

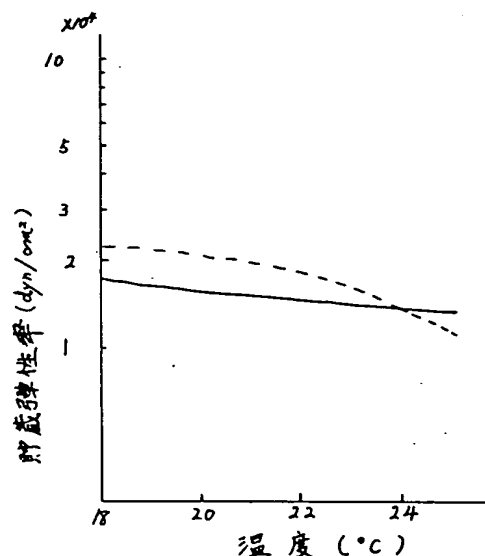
上表からわかるようにいずれの場合も加熱処理した方がゲル強度が増加した。

4 図面の簡単な説明

図1は実施例6の結果を示す。図中、横軸は温度(℃)、縦軸は貯蔵弾性率 (dyn/cm²) であり、実線は本発明のセラチンTGaseゲルを、破線はセラチン冷却ゲルを示す。

特許出願人 味の素株式会社

図 1



手続補正書

昭和57年10月6日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許願31978号

2. 発明の名称

ゲル化物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区京橋一丁目5番8号

名 称 (006)味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌田勝弘



4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正により増加する発明の数 な し

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄



7. 補正の内容

(1) 明細書第6頁第12行の「Protecn」を「Protein」に補正

する。

(2) 明細書第9頁第7行の「5■M・トリス」を「5■M トリス」に補正する。

(3) 明細書第10頁第14行の「Gel」を「Gel」に補正する。

(4) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「化学物及び」を「化学物」及び「に」に補正する。

(5) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「Dacry」を「Dairy」に補正する。

(6) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「共器機」を「共益機」に補正する。

(7) 明細書第12頁表1の大豆蛋白11Sグロブリンの欄の「クレーク」を「フレーク」に補正する。

(8) 明細書第16頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。

(9) 明細書第17頁表3欄外の「△:ゲルする」を「△:ゲル化する」に補正する。

(10) 明細書第17頁下から第7行の「CaI₂」を「CaCl₂」に補正する。

(11) 明細書第17頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。

(12) 明細書第18頁下から第9行の「高さ1.5■」を「高さ15■」に補正する。